

# CESI-MS和CE-UV对科博肽中杂质的分离、鉴定和定量分析

## Separation, identification and quantification of associated impurities in cobratide using CESI-MS and CE-UV

王文涛<sup>1</sup>, 高铁<sup>1</sup>, 刘博<sup>2</sup>, 陈泓序<sup>1</sup>

Wang Wentao<sup>1</sup>, Gao Tie<sup>1</sup>, Liu Bo<sup>2</sup>, Chen Hongxu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> SCIEX 中国; <sup>2</sup> 中国食品药品检定研究院

<sup>1</sup> SCIEX China; <sup>2</sup> National Institute for Food and Drug Control

**Key Words:** Cobratide; CESI-MS/MS; CE-UV;

CE-UV方法的联合使用, 可实现对科博肽药物中杂质的定性表征与定量分析, 更加有助于对多肽类药物进行质量控制。

### 1. 引言

科博肽药物是从中华眼镜蛇的蛇毒中提取获得的多肽类药物, 是一种治疗多种慢性疼痛的强效镇痛药, 因其具有镇痛持久、成瘾性低等特点而被广泛应用于慢性、顽固性、持续性疼痛的临床治疗中。科博肽主要通过凝胶色谱分离的方式进行纯化, 其产品中可能存在较多与主成分分子量相近(如脱酰胺化、序列错配等)、结构与色谱性质高度相似的杂质(如序列缺失)。现行质量标准中, 采用高效液相色谱法(HPLC)用于科博肽药物的纯度分析, 但该方法无法实现主成分与杂质之间的有效分离。本文利用无鞘液式毛细管电泳-质谱联用技术(CESI-MS)对科博肽药物中相关杂质进行了分离和鉴定, 并利用毛细管电泳-紫外检测器(CE-UV)方法进行了快速分离和定量, 工作流程如图1所示。实验结果证明, CESI-MS与

### 2. 实验部分

#### 2.1. 实验仪器及试剂

CESI 8000 Plus高效毛细管电泳电喷雾离子化系统(SCIEX), NanoSpray™ III离子源(SCIEX), TripleTOF™ 5600+ LC-MS/MS系统(SCIEX, 数据采集软件: Analyst™软件; 数据分析软件: PeakView™软件和BioPharmaView™软件), OptiMS熔融石英毛细管卡盒(91 cm × 30 μm ID, SCIEX), 熔融石英毛细管(30.2 cm × 50 μm ID, SCIEX)。冰醋酸(HAc, 质谱纯, Sigma-Aldrich公司), 二次去离子水(Millipore公司), 甲醇(质谱纯, Merck公司)。背景电解质(BGE)和导电液均为: 50 mM NH<sub>4</sub>Ac, pH 4.0。

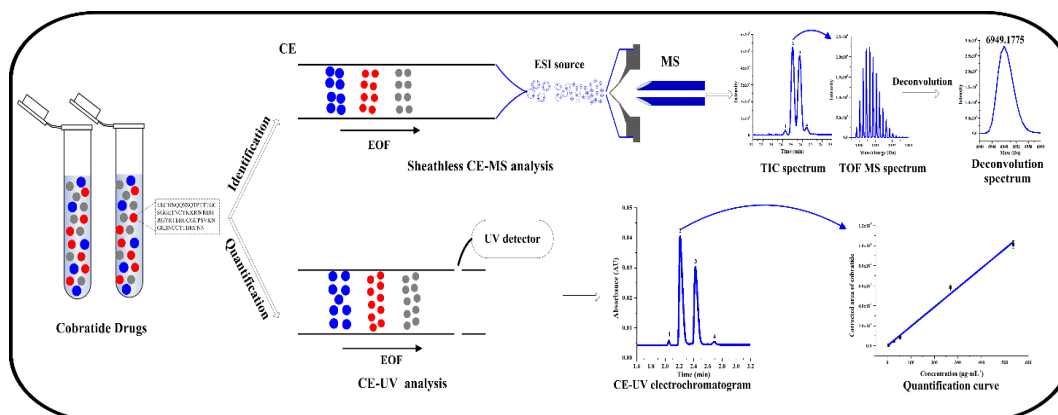


图1. CESI-MS和CE-UV法对科博肽药物鉴定和定量的示意图

**CESI-MS方法**：OptiMS熔融石英毛细管卡盒初次使用时，用甲醇在100 psi下冲洗分离毛细管10分钟，然后分别依次用水、0.1 M NaOH、0.1 M HCl和水在100 psi下各冲洗10分钟，最后用BGE在100 psi下冲洗10分钟。在针与针之间依次用0.1 M NaOH、0.1 M HCl和水在100 psi下各冲洗4分钟，最后用BGE在100 psi下冲洗5分钟。

**CE-UV方法**：熔融石英毛细管初次使用时，依次用0.1 M NaOH、0.1 M HCl和水在20 psi下各冲洗5分钟，最后用BGE在20 psi下冲洗5分钟，并在20 kV电压下平衡10分钟。在每针运行之间依次用0.10 M NaOH、0.10 M HCl和水在20 psi下各冲洗2分钟，最后用BGE在20 psi下冲洗5分钟。

## 2.2. 背景缓冲液 (BGE) 配置

准确移取333.3  $\mu$ L的7.5 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$ 溶液置于50 mL容量瓶中，加入约40 mL去离子水，用冰醋酸调节pH值至4.0，涡旋混匀后，用去离子水准确定容至50 mL。不使用时，置于4°C冰箱保存。

## 2.3. 实验方法设置

2.3.1. CESI-MS方法 (见下表)

2.3.2. CE-UV方法

CE-UV方法利用UV检测器，检测波长为214 nm；熔融石英毛细管：50  $\mu$ m，30.2 cm  $\times$  20 cm；BGE类型：50 mM  $\text{NH}_4\text{Ac}$ ，pH 4.0；样品缓冲液：二次去离子水；毛细管温度：25  $^{\circ}\text{C}$ ；样品温度：10  $^{\circ}\text{C}$ ；分离条件：20 kV，5 min；进样条件：0.5 psi 10 s 样品。

## 2.4. 样品处理

科博肽样品 (S1) 来自国内某生产厂家，在-20  $^{\circ}\text{C}$ 下保存。分别精密称取10 mg科博肽粉末置于1.50 mL的离心管中，加入1 mL的去离子水，制备得到10 mg/mL的溶液；进样前，用超纯水（或其他适当样品缓冲液）稀释至1 mg/mL。不使用时，置于4°C冰箱保存。

## 3. 结果与讨论

### 3.1. CESI-MS方法对科博肽及相关杂质的分离和鉴定

为了提高定量的准确度，本文首先利用CESI-MS方法对科博肽及其相关杂质进行了分离和鉴定。对影响分离的实验参数进行了优化，包括运行缓冲液的pH值及其盐离子浓度、有机添加剂的比例和样品缓冲液的类型等。最终确定最佳分离条件为：运行缓冲液：50 mM  $\text{NH}_4\text{Ac}$ ，pH4.0；样品缓冲液：二次去离子。基于以上最佳实验条件，CESI-MS方法的分离结果如图2A所示，利用CESI-MS方法，科博肽及其相关杂质可以实现高效分离。

为了实现对科博肽药物中相关杂质的准确鉴定，本实验借助于商品化的数据解析软件BiopharmaView™对CESI-MS的分析结果进行了解析，去卷积结果如表1所示。通过解析可以发现，三种主要杂质分别为脱酰胺化降解产物、脯氨酸缺失的降解产物以及氨基酸替换的降解产物。

CE条件设置		MS条件设置	
CE 类型	CESI 8000 Plus	质谱型号	Triple TOF™ 5600+ LC-MS/MS系统
CE 卡盒	OptiMS 熔融石英毛细管卡盒	极性	正离子模式
BGE	50 mM $\text{NH}_4\text{Ac}$ , pH 4.0	Gas 1/2	0
导电液	50 mM $\text{NH}_4\text{Ac}$ , pH 4.0	Curtain Gas	5
样品缓冲液	100 mM $\text{NH}_4\text{Ac}$ , pH 4.0	ISVF	+1650 V
毛细管温度	25 $^{\circ}\text{C}$	Temperature	50 $^{\circ}\text{C}$
样品温度	10 $^{\circ}\text{C}$	MS Scan Range ( m/z )	800~2000
分离条件	10 kV, 35 min with 1.0 psi	MS Accumulation time	250 ms
进样	压力进样: 0.5 psi 60 s 样品;	DP	100
	2.5 psi 25 s BGE;	CE	10

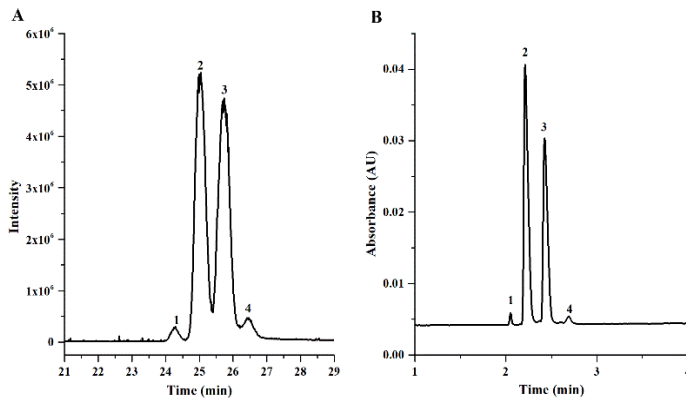


图2. CESI-MS和CE-UV方法对科博肽药物S1分析的分离谱图。(A)科博肽药物S1在最优化CESI-MS条件下的分离谱图；(B)科博肽药物S1在最优化CE-UV条件下的分离谱图。峰的确证：2为主成分峰，1、3、4为杂质峰。

表1. 科博肽S1主峰及其杂质峰的CESI-MS鉴定结果

峰	分子量 (Da)	质量偏差(Da)	鉴定结果
1	6851.2470	-97.9305	Loss of Pro
2	6949.1775	0	Cobratide
3	6950.1595	+0.9802	Asn → Asp
4	7008.2215	+59.0440	Pro → Arg

### 3.2. CE-UV方法对科博肽及其相关杂质的分离和定量分析

由于低成本、易操作的特点，基于光学检测器（如UV检测器、PDA检测器等）更加有助于药物的质控分析。本文基于CESI-MS分析的最佳分离条件，利用50 μm内径、30.20 cm总长的毛细管，借助于UV检测器对科博肽及其相关杂质进行了分离和定量，如图2B所示。如表2所示为科博肽及其相关杂质的校正峰面积，通过CE-UV方法的分析可得科博肽样品S1的纯度为53.63%。

表2. 科博肽S1的CE-UV方法纯度分析结果

峰	鉴定结果	迁移时间 (min)	校正峰面积百分比 (%)
1	Loss of Pro	2.11	1.31
2	Cobratide	2.30	53.63
3	Asn → Asp	2.52	42.86
4	Pro → Arg	2.80	2.20

## 4. 结论

首先建立了CESI-MS方法对科博肽药物中的主要杂质进行了分离和鉴定，三种主要杂质分别为脱酰胺降解杂质、脯氨酸缺失的降解产物以及氨基酸替换的降解产物。其次，建立了一种快速、高灵敏的CE-UV方法对科博肽杂质进行了准确的定量分析。该方案的优点如下：

- 1) CESI-MS方法：分离度高，借助于成熟的商品化的数据处理软件，可获得每一杂质的精确分子量，进而可以有效确定杂质的来源。
- 2) CE-UV方法：分离度高，分析速度快，分析时间低至3 min；灵敏度高，LOQ可达到4.16 μg/mL。
- 3) 该方案可以快速、高效的对科博肽药物的相关杂质进行鉴定和定量，更好地有助于对科博肽药物的质量控制。
- 4) 该方案成功应用于科博肽样品批次一致性的分析，有助于对上游的纯化工艺提供指导意义。
- 5) 该方案有望进一步应用于其他难分离多肽药物的杂质鉴定及纯度分析研究中。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2021 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-13821-ZH-A



### SCIEX中国

北京分公司  
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院  
1号楼5层  
电话：010-5808-1388  
传真：010-5808-1390  
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心  
上海市长宁区福泉北路518号  
1座502室  
电话：021-2419-7200  
传真：021-2419-7333  
官网：[sciex.com.cn](http://sciex.com.cn)

广州分公司  
广州市天河区珠江西路15号  
珠江城1907室  
电话：020-8510-0200  
传真：020-3876-0835  
官方微信：SCIEX-China